

二氯甲烷降解菌的研究

王家德,陈建孟,于建明 (浙江工业大学环境科学与工程研究所,浙江 杭州 310032)

摘要: 通过驯化、筛选和富集培养,从制药厂(Y)和农药厂(N)生化曝气池的活性污泥中分离到 2 株能以二氯甲烷为唯一碳源和能源而生长的菌株.菌种初步鉴定为假单胞杆菌属和放线菌科分枝杆菌属.由正交试验得出 GD11、GD23 两株菌的最适培养条件:GD11 温度 28.5℃,pH 值 6.0,纱布层数 6;GD23 温度 25℃,pH 值 7.2,纱布层数 4.研究发现 NaCl 浓度对菌株的降解率有不同程度的抑制作用.

关键词: 二氯甲烷;生物降解

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(2001)06-0503-04

Studies on dichloromethane degradation of bacterium. WANG Jia-de, CHEN Jian-meng, YU Jian-ming (Institute of Environmental Science and Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China). *China Environmental Science*. 2001,21(6): 503~506

Abstract: Two strains identified preliminarily as *Pseudomonas* and *Mycobacterium* that could grow with dichloromethane as the sole carbon and energy sources were isolated by enriching, screening and culturing from drug and pesticides factories activated sludge of aerated pond. By orthogonal test, it was indicated that *Pseudomonas* GD11 could grow with best culture conditions of pH6.0, 28.5℃, 6 layers of gauze and *Mycobacterium* GD23 could grow with those of pH7.2, 25℃, 4 layers of gauze. It was also observed that NaCl concentration had different degrees of inhibition to the degradation rate of the strains.

Key words: dichloromethane; biodegradation

二氯甲烷是一类使用非常广泛的化学试剂,主要在金属材料去油污、除漆行业和制药工业等方面作溶剂使用.由于其沸点低(40.1℃)、蒸汽压高(20℃时 47Pa),气态排放是其进入环境的主要方式.当前,二氯甲烷和四氯乙烯被认为是大气污染中毒性较大的卤代烃类物质,工业废气中二氯甲烷排放浓度必须低于 150mg/Nm³.因此探索有效的处理技术有重要的社会和环境意义.

通过近 20 年的研究^[1-3],人们充分肯定了微生物降解工业废气中有机物的效果,其对有机物的去除率在 90%以上,且具有投资少、运行费用低、能耗小及管理方便等优点,成为低浓度有机废气(<2000mg/Nm³)治理的一个发展方向.二氯甲烷被微生物降解的机理是在谷胱甘肽二氯甲烷脱卤酶作用下产生甲醛和 HCl^[4].国外 Galli、Hatmans、Diks 等在此方面做了大量的研究工作^[5-7],但在国内未见(仅见甲苯、乐果、氯乙酸等生物降解^[8-11])有关的报道.

针对上述情况,进行二氯甲烷降解菌实验研

究,探索用生物技术处理含二氯甲烷有机废气,笔者从制药厂(简称 Y)、农药厂(简称 N)废水处理站活性污泥中驯化分离出 2 株二氯甲烷降解菌,通过正交试验得出其最适培养条件,并对降解特性作相应的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 污泥采样 从 Y 和 N 的生化曝气池中采取 2 个活性污泥样品,经 100 目筛过滤、调节 pH 值等预处理后的悬浮液作菌种筛选驯化.

1.1.2 培养基 无机盐培养基参考文献[5].

1.2 方法

1.2.1 降解菌的驯化 将预处理后的悬浮液按 10%的接种量分接于 250mL 的三角瓶,用 4 层纱布包扎,在 28.5℃、200r/min 的摇床上通风培养.由于二氯甲烷沸点低(约 40.1℃)、易挥发,故驯

收稿日期: 2001-03-07

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(297049)

化期间二氯甲烷的添加实行少量多次,每天补 3 次碳源,每周换 1 次培养基.从反应机理可知,二氯甲烷降解后产 H^+ ,pH 值下降,故通过 pH 值变化可以定性地反映底物降解及菌生长情况.

1.2.2 降解菌的分离和纯化 在无碳平板上涂布菌悬液,倒置平板,在皿盖上加一大块无菌棉花,棉花中滴适量的二氯甲烷,置 30°C 下培养,定时补加二氯甲烷,2~3d 后,平板上长出了丰厚的菌苔,对照平板的棉花中加蒸馏水,无菌苔出现.获得的单菌落转入 $\phi 20\times 200\text{mm}$ 大试管斜面,在斜管的对面试管壁上放置含待降解物的棉花,便可获得斜面菌种.

1.2.3 菌种鉴定 用电子显微摄像技术观察分离菌株 GD11 和 GD23 外形并进行生理特征鉴定.

1.2.4 氯离子测定 用氯离子选择电极和双液接参比电极测定释放的氯离子浓度.

1.2.5 pH 值 用 3675 型 pH 自控系统(美国)在线测定、调整.

1.2.6 二氯甲烷浓度分析 102GD(上海)型气相色谱仪热导监测器检测.载气为氢气,柱温 70°C ,检测温度 90°C ,桥电流 200mA.

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

从 Y、N 采取的泥样经 30°C 、25d 的驯化筛选(图 1),培养基 pH 值由原来的 6.8~7.9 降至 3.4~4.0,镜检观察到大量的粗壮杆菌,而对照组培养基 pH 值基本无变化,说明驯化成功.

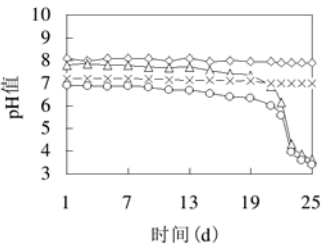


图 1 菌种驯化示意

Fig.1 Acclimation test of strains

—◇—接 N 污泥(无二氯甲烷) —△—接 N 污泥(加二氯甲烷)
—×—接 Y 污泥(无二氯甲烷) —○—接 Y 污泥(加二氯甲烷)

驯化后的菌悬液经 30°C 、2d 涂布、划线培养,有碳(二氯甲烷)培养基表面,长出丰厚的菌苔,对照培养基无菌苔出现,说明驯化分离出来的单菌落能以二氯甲烷为碳源生长繁殖,此培养基内二氯甲烷是唯一碳源.按《一般细菌常用鉴定方法》对分离出来的 2 株菌进行鉴定,结果如表 1 所示.对照《伯杰氏手册》可知,GD11 为假单胞杆菌属,GD23 为放线菌科分枝杆菌属.

表 1 菌种鉴定结果

Table 1 Result of indentified strains GD11 and GD23

项目	菌 种	
	GD11	GD23
个体形态	两端圆形杆菌	两端圆形杆菌
革兰氏染色	阳	阳
芽孢染色	无	有
荚膜染色	有	无
鞭毛染色	无	无
糖发酵试验	产酸不产气	不产酸不产气
吡啶试验	阴	阴
甲基红试验	阴	阴
V.P 试验	阳	阴
柠檬酸盐试验	阴	阳
过氧化氢酶试验	阴	阳
与氧的关系	好氧	好氧
营养型	兼性自养	异养
菌落形态特征	浅黄色,湿润,突起光滑,四周整齐	棕色,干燥,突起,四周平坦且向外扩散

2.2 菌种培养条件

温度、湿度、pH 值、供氧量、渗透压等理化因素对菌的生长代谢均有影响,在正交试验前对一些单因素作初步探索.结果表明,温度、pH 值及供氧量等因素影响较大,较适范围是温度 $25\sim 32^{\circ}\text{C}$,pH 值(GD11)5.0~7.5、(GD23)6.0~8.0,供氧量通过纱布层数控制,纱布层数以 2~6 层为宜.

选取温度、pH 值、纱布层数为主要因素设计成三因素三水平的正交试验,如表 2 所示.按正交表的波长测菌液吸光度(OD_{600}),通过标准曲线读出菌浓度,而后比较大小,结果如表 3 所示.在所选定因素范围内,温度对菌体生长影响最大, pH 值和供氧量的影响接近.GD11 菌种最适培养条件为温度 28.5°C ,pH 值 6.0,纱布 6 层;GD23 菌种

最适培养条件为温度 25℃,pH 值 7.2,纱布 4 层。
以后实验中菌种均在此条件下培养。

表 2 正交试验设计
Table 2 Design of orthogonal test

水平	pH 值		温度 (℃)	通氧量 (纱布层数)
	(Y)	(N)		
1	5	6	25	2
2	6	7.2	28.5	4
3	7.2	8	32	6

表 3 GD11、GD23 菌种正交试验结果
Table 3 Orthogonal test results of strains GD11 and GD23

试验 序号	pH 值	温度 ℃	通氧量 (纱布层数)	吸光度		C _菌 10 ⁸	
				Y	N	Y	N
1	1	1	1	0.51	0.59	1.134	4.860
2	1	2	2	0.49	0.17	1.125	0.270
3	1	3	3	0.32	0.20	0.608	0.432
4	2	1	2	0.56	0.73	1.296	6.237
5	2	2	3	0.63	0.38	2.106	2.106
6	2	3	1	0.30	0.40	0.54	2.808
7	3	1	3	0.54	0.68	1.269	5.670
8	3	2	1	0.44	0.18	1.094	0.280
9	3	3	2	0.20	0.64	0.243	5.184
$K_1 = K_{1j}/3$							
	Y	0.956	1.233	0.923			
	N	1.854	5.589	2.649			
$K_2 = K_{2j}/3$							
	Y	1.314	1.485	0.932			
	N	3.717	0.885	3.897			
$K_3 = K_{3j}/3$							
	Y	0.869	0.464	1.328			
	N	3.711	2.808	2.736			
R_j							
	Y	0.445	1.022	0.405			
	N	1.863	4.704	1.248			
最适值							
	Y	2(6)	2(28.5)	3(6)			
	N	2(7.2)	1(25)	2(4)			

注: C_菌 为单位体积菌个数,括号中数据为正交试验中因数水平对应的参数值,K_i为 i 水平的目标值,K_{ij}为 i 水平 j 因素的目标值,R_j为 j 因素目标值的极差

2.3 生长特性

图 2,图 3 给出了菌株 GD11 利用二氯甲烷的情况.从图 2,图 3 可以看出,GD11 菌株能以二氯甲烷作为碳源迅速生长,培养约 80h 后,菌体增加和氯离子释放均达到最高峰,pH 值从 7.0 下降至 3.0.从图 2 还可以发现,菌体生长有一个较长的延迟期(适应期),约 40h 左右。

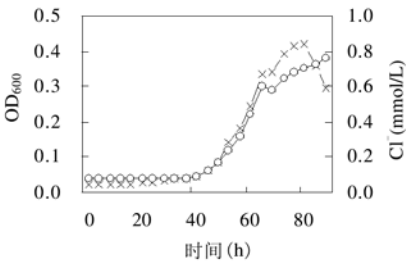


图 2 GD11 菌种的生长曲线

Fig.2 Growth curves of GD11

—×—菌体生长 —○— Cl⁻浓度

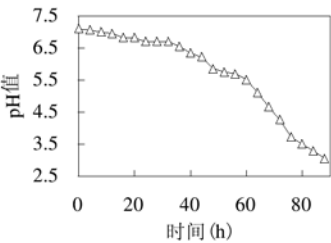


图 3 GD11 菌种生长过程中 pH 变化曲线

Fig.3 pH curve of GD11 growth

2.4 缩短适应期

实验采取在新鲜培养基中接入 0.01%的酵母提取物,与不加酵母提取物比较适应期的长短,以探明利用碳氮源对缩短菌种适应期的影响。

图 4 表明,当在培养基中加入 0.01%的酵母提取物时,因其含有丰富营养源,不仅为菌体提供氮源,同时也提供丰富的碳源,大大促进了菌体的生长,适应期由原来的 2d 缩短至 1d 左右。

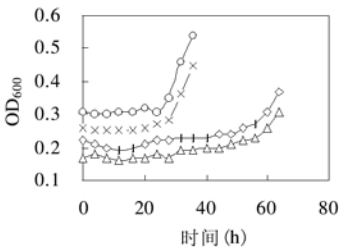


图 4 GD11 菌种的适应期长短

Fig.4 Adaptive life of GD11

—◇— 未加酵母提取物(N) —○— 加酵母提取物(N)
—△— 未加酵母提取物(Y) —×— 加酵母提取物(Y)

2.5 NaCl 浓度对二氯甲烷降解的影响

在微生物降解二氯甲烷的过程产生 Cl^- 、 H^+ , 用 NaOH 调 pH 值, 会有 NaCl 积累问题. 当 NaCl 浓度过高时, 会使细胞内外的渗透压增加而使细胞内作为生化反应催化剂的蛋白酶部分失活, 同时 Cl^- 本身对细胞有毒害作用. 具体的研究方法是先作标准曲线, 通过测培养基的电导率得出 NaCl 浓度, 同时观察二氯甲烷去除率, 获得 NaCl 浓度增加对去除率的影响规律.

用 GD11 菌作为试验对象, 并以空白培养基为对照. 另外 4 瓶培养基中的 NaCl 浓度分别为 200, 400, 600, 800 mmol/L, 一次性加入二氯甲烷, 每小时测 1 次二氯甲烷含量.

由图 5 中可以看出, NaCl 浓度在逐渐升高 (≥ 600 mmol/L) 时, 菌株降解二氯甲烷渐受抑制, 当升至 800 mmol/L 时, 二氯甲烷已基本不能被降解, 空白与接有降解菌的培养条件二氯甲烷损耗线近乎重合.

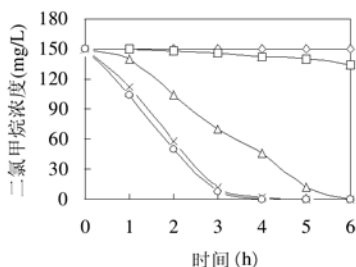


图 5 NaCl 对二氯甲烷降解的抑制曲线

Fig.5 Inhibition curves of the dichloromethane degradation with NaCl

—◇— 空白 —□— 800mmol/L —△— 600mmol/L
—×— 400mmol/L —○— 200mmol/L

3 结论

3.1 从制药厂和农药厂分离到 2 株能高效降解二氯甲烷的菌株 GD11、GD23, 它们能以二氯甲烷为唯一的碳源和能源, 经初步鉴定 GD11、GD23 为假单胞杆菌属和分枝杆菌属.

3.2 在新鲜培养基中加入酵母提取物可有效缩短菌种的适应期, 这对进一步工业化应用研究有较大的意义.

3.3 通过正交试验得出两株菌的最适培养条件. GD11 菌: 温度 28.5℃, pH 值 6.0, 纱布 6 层; GD23 菌: 温度 25℃, pH 值 7.2, 纱布 4 层.

3.4 NaCl 对二氯甲烷降解菌的完全抑制浓度为 800 mmol/L, 影响浓度为 600 mmol/L.

参考文献:

- [1] Ronald A Z, Mathew T T, Gary W G. Treatment of volatile organic compounds in a pilot scale biofilter [J]. Air and Waste Management, 1993, (7): 1-8.
- [2] 陈建孟, 王家德, 唐翔宇. 生物技术在有机废气处理中的研究进展 [J]. 环境科学进展, 1998, 17(4): 21-24.
- [3] Kirchner K, Schlachter L. Biological purification of exhaust air using fixed bacterial monocultures [J]. Appl. Microbiol. and Biotech., 1989, 31(6): 629-632.
- [4] Brunner W B, Staub D, Leisinger T. Bacterial degradation of dichloromethane [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1980, 40: 950-958.
- [5] Hartmans D S, Tramper J. Dichloromethane removal from waste gases with a trickle-bed bioreactor [J]. Bioprocess Eng., 1991, 6: 83-92.
- [6] Diks R M M, Ottengraf P P. Verification studies of a simplified model for the removal of dichloromethane from waste gases using a biological trickling filter [J]. Bioprocess Eng., 1991, 6(3): 93-99.
- [7] Galli R. Biodegradation of dichloromethane in wastewater using a fluidized bed bioreactor [J]. Appl. Microbiol Biotechnol., 1987, 27: 206-213.
- [8] 孙佩石, 杨显万, 黄若华, 等. 生物法净化有机废气中低浓度挥发性有机物的过程机理研究 [J]. 中国环境科学, 1997, 6(12): 545-549.
- [9] 刘玉焕, 钟英长. 真菌降解有机磷农药乐果的研究 [J]. 环境科学学报, 2000, 20(1): 95-99.
- [10] 陈勇生, 庄源益, 戴树桂. 2,4-二氯酚降解菌的分离及其特性 [J]. 环境科学学报, 1999, 19(1): 28-32.
- [11] 王银善, 庞学军, 李明, 等. 假单胞菌 No.66 降解氯酸的研究 [J]. 环境科学学报, 1987, 7(1): 107-112.

作者简介: 王家德(1968-), 男, 浙江常山县人, 讲师, 在职博士, 现在浙江工业大学环境科学与工程研究所工作, 主要从事环境生物技术和环境电化学等领域的研究. 承担了浙江省自然科学基金项目“生物膜填料塔净化有机废气的传质—降解过程”, 浙江省科技厅重点资助项目“工业有机废气回收净化系统”; “电催化氧化技术处理高浓度有机废水的应用研究”等研究工作. 发表论文 10 余篇.